



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12P 21/02 // C07K 14/51, C12N 15/09, (C12P 21/02, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO98/29559 (43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04784 (22) 国際出願日 1997年12月24日(24.12.97) (30) 優先権データ 特願平8/355812 1996年12月25日(25.12.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 (HOECHST MARION ROUSSEL LTD.)[JP/JP] 〒107 東京都港区赤坂二丁目17番51号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 本田 淳(HONDA, Jun)[JP/JP] 安藤英俊(ANDOU, Hidetoshi)[JP/JP] 杉本俊二郎(SUGIMOTO, Shunjiro)[JP/JP] 〒350-1165 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 バイオ医薬品開発センター内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: PROCESS FOR PREPARING PURIFIED DIMER OF BONE-DERIVED FACTOR (54)発明の名称 精製された骨誘導因子二量体の製造方法 (57) Abstract A process for preparing a purified dimer of a bone-derived factor, which comprises subjecting an inclusion body of a bone-derived factor produced by genetic engineering to the following steps a) to e) in sequence: a) the step of treating an inclusion body of a bone-derived factor with an unfolding agent to prepare a solubilized monomer; b) the step of treating the solubilized monomer with a refolding solution to prepare a dimer; c) the step of subjecting the refolded dimer to ultrafiltration and solvent replacement; d) the step of subjecting the dimer solution prepared above to isoelectric precipitation; and e) the step of subjecting the isoelectrically precipitated dimer to reversed phase chromatography.		

(57) 要約

精製された骨誘導因子二量体の製造方法。遺伝子工学的的方法により産生された骨誘導因子の封入体を下記工程 a) ～ e) に順次付することにより精製された骨誘導因子二量体が得られる。

- a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程、
- b) 得られた可溶化単量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程、
- c) リフォールディングした二量体を限外ろ過および溶媒置換処理する工程、
- d) 上記処理により得られた二量体溶液を等電点沈殿処理する工程、
- e) 等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。

PCTに基づいて公開される国際出願のパムフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	GE	ジョージア	MC	モナコ	SG	シンガポール
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガナ	MD	モルドバ	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	SL	シエラレオネ
BF	ブルキナ・ファソ	HN	ホンジュラス	ML	マリナ		
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル		
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア		
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	モザンビーク		
BS	バハマ	IL	イスラエル	MX	メキシコ		
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ニジェール		
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ		
CG	コンゴ	JP	日本	NO	ノルウェー		
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CN	中国	LC	セント・ルシア	SD	スーダン		
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
CU	キューバ	LR	リベリア	SG	シンガポール		
CZ	チェコ	LS	レソト	SK	スロバキア		
DE	ドイツ			SL	シエラレオネ		
DK	デンマーク						
EE	エストニア						

明 細 書

精製された骨誘導因子二量体の製造方法

技 術 分 野

本発明は、精製された骨誘導因子二量体の製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は遺伝子工学的的方法により産生された骨誘導因子の封入体から精製された骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする骨誘導因子二量体の製造方法に関する。

背 景 技 術

骨基質に蛋白性の骨誘導因子が存在することが発見され (Science 150, pp. 893-899, 1965)、bone morphogenetic protein (以下BMPと略す) と命名された。近年、複数のBMP関連遺伝子がクローニングされ、いずれもトランスフォーミング成長因子 β (以下TGF β と略す) スーパーファミリーに属していることが知られている。これらのうちいくつかは遺伝子工学による組換え体が生産され、それを用いて骨誘導活性が確認され、骨疾患治療への応用が期待されている。

それらの内、最近発見されたヒト由来のBMPファミリーに属するGDF-5 (MP 52) (Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, pp. 646-652, 1994) は動物実験により骨誘導因子として有効であることが確認され、また遺伝子組み換え大腸菌による発現で大量に生産する技術が試みられている。しかし大腸菌等に大量に発現させた場合、例えば、1リットル培養液中数グラム蛋白質を産生させた場合、目的蛋白質は一般に不活性な不溶性の封入体 (顆粒体、inclusion body) を形成しがちである。この封入体は単量体であり、骨誘導因子として活性のある二量体を得るにはこの封入体を可溶化し、本来の構造である二量体に再生 (一般にリフォールディング (refolding) と呼ばれる操作) し、分離・精製を行ない目的の蛋白質を得る必要がある。

MP 52の活性型は、

1) 水溶液中の溶解度が低く、変性剤存在下あるいは酸性条件下で扱わなく

てはならないこと、

- 2) 分離に使われる蛋白質が液体クロマトグラフィー用担体に非特異的に吸着すること、
- 3) リフォールディング時に不可欠な界面活性剤が分離の際の障害になること

等の問題を抱えており、精製法の確立は困難を極めた。

上記を解決するために最近開発された精製法 (WO 96/33215) では、

1. 封入体を変性剤で可溶化する工程、
2. イオン交換クロマトグラフィーによる分離工程、
3. スルホン化工程、
4. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離工程、
5. リフォールディング工程、
6. 等電点沈殿による回収工程、
7. 逆相クロマトグラフィーによる分離工程

の各工程を経て単一の活性型MP 5 2を得ている。

しかしこの方法を工業的規模に拡大するには、

- 1) MP 5 2封入体を可溶化するための変性剤を多量に消費すること、またそれによる蛋白質の修飾 (たとえば、尿素の場合であればカルバミル化反応) を誘発すること、
- 2) クロマトグラフィーの担体、特にゲルろ過クロマトグラフィーにおいては例えばセファクリルS-200HR、スーパーデックス200pg (いずれもファルマシアバイオテック製) のような高価なものを大量に使用すること、
- 3) リフォールディングの際に使用する試薬、とりわけ二量体化反応に欠かせないCHAPSと酸化型グルタチオンが非常に高価であること、
- 4) 等電点沈殿を行う際、界面活性剤濃度を下げるための希釈操作を行うため液量が大きくなること

等の問題がある。

発 明 の 開 示

本発明の目的は上記の問題を解決すること、即ち

- 1) 変性剤の使用を極力抑える、
- 2) クロマトグラフィー担体の使用量を極力抑える、
- 3) リフォールディングの際に使用する試薬を他の安価なものに置き換える、
- 4) 界面活性剤の選択的除去により液量を調整する

こと、およびこれらに付随する操作の簡略化すなわち、時間の大幅短縮にある。

本発明者らは、大腸菌から抽出した封入体を変性剤存在下で可溶化させたのち、希釈操作でリフォールディングを直接行ない、次いで限外ろ過することにより、精製工程の簡略化を可能にした。この手法は大腸菌からヒトインスリンを製造する方法 (EP 600372A1) の最初の工程に類似するが、骨誘導因子の場合はヒトインスリンのような水溶性蛋白質とは性質が異なるため、上記インスリン製造方法をそのまま骨誘導因子に応用するのは困難であった。大量に生産する場合には前述のように二量体化したMP 5 2 (活性型) は溶解度が低く、またクロマトグラフィー担体に吸着する性質を持つため、ヒトインスリンで使用するイオン交換や疎水クロマトグラフィーあるいは前記WO 96/33215で使用するゲルろ過クロマトグラフィーは使用できない。例えばイオン交換 (ファルマシアバイオテック、SP Sepharose FF) を用いた場合、変性剤を使用して塩濃度を最大にしても担体への吸着が強く、MP 5 2は完全に溶出されない。ゲルろ過 (ファルマシアバイオテック、Sephacryl S-200HR) を用いた場合、変性剤を使用しても担体への吸着が強く、分画範囲が極端に広がってしまい分離が非常に悪い。また、CHAPSの影響により担体の性質が変化し、再現性がなくなる。MP 5 2が溶解する酸性溶液による溶出についても同様で、結論として担体本来の性質を生か

して使用することができない。

以上のように、一般の水性系クロマトグラフィーの方法では大量生産の場合目的蛋白質の精製が行えないことが明らかとなった。唯一利用出来たのは有機溶媒を用いた逆相クロマトグラフィーのみであったため、カラムを多用しない精製法を開発する必要があった。カラム以外の精製法としては硫酸アンモニウム分画法が有望と思われた。しかし、精製効果が小さいこと、またそれゆえ不必要な収率低下を招くことからその手法は使用せず、pH調節による等電点沈殿法を用い、実際の操作前に限外ろ過工程を行い、界面活性剤のCHAPSを除去し、液量を増加させることなく等電点沈殿を行えるようにした。従来は、CHAPSが存在していると蛋白質の溶解度が大きいいため沈殿が起きず、希釈操作によりCHAPS濃度を下げていたが、そうすると液量が大幅に増加し、それが精製工程上問題となっていた。

本発明は、遺伝子工学的的方法により産生された骨誘導因子の封入体を下記工程a)～e)に順次付して精製された骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする骨誘導因子二量体の製造方法からなる。

- a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程、
- b) 得られた可溶化単量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程、
- c) リフォールディングした二量体を限外ろ過および溶媒置換処理する工程、
- d) 上記処理により得られた二量体溶液を等電点沈殿処理する工程、
- e) 等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。

遺伝子工学的的方法により産生された骨誘導因子の封入体としては、遺伝子工学的的方法により大腸菌に発現させたものが好ましい。

骨誘導因子を大腸菌に発現させた場合、菌体を緩衝液に懸濁し、菌体破碎装置で破碎し、遠心分離により封入体を回収する。封入体を洗浄成分含有バッファー、例えば Triton X-100、または尿素で3回以上洗浄後、遠心分離

を行い粗精製された封入体を得る。

骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程は、封入体を変性剤を含む溶液に加え、攪拌して溶解させることによって実施される。変性剤を含む溶液としては、従来公知のもの、例えば8 M尿素または6 M塩酸グアニジンなどを含む50 mMグリシン-水酸化ナトリウムバッファー (pH 10.7) などが用いられる。

可溶化単量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程は、上で得られた蛋白質の溶液を蛋白質終濃度で0.1～5.0 mg/mL、好ましくは2.4 mg/mLになるように希釈して実施される。従来、変性剤の終濃度が1 M以下となるように希釈されていたが、本発明においては、変性剤の終濃度が1～4 M、特に2.4 Mとなるように希釈するのが蛋白質の凝集、沈殿を防ぎ、収率を向上させるので好ましい。リフォールディング溶液としては、従来公知のもの、例えばコール酸またはその誘導体、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルフォネート (CHAPS)、タウロコール酸またはその塩、タウロデオキシコール酸またはその塩、好ましくは3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルフォネート (CHAPS) などの界面活性剤；EDTA；メルカプトエタノールもしくはDTTなどの還元剤と酸化型グルタチオンとの組み合わせまたはシステインなどを含む緩衝液が用いられる。システインのみを用いるメリットは、一般的に高価な酸化試薬を使う必要がないことおよびその使用量を少なくできること等があり、従って試薬コストの低下と工程の簡略化が期待できるためである。

蛋白質の凝集、沈殿を防ぎ、収率を向上させるのに効果を発揮する他の試薬としてグアニジノ基を有する化合物があげられる。例えばグアニジン塩酸塩あるいはアルギニン塩酸塩等があり、好ましくはアルギニン塩酸塩を0.5 Mになるようにあらかじめリフォールディング溶液に加える。表1に、添加されたアルギニン塩酸塩の効果を示す。

表 1

蛋白質濃度 (g/L)	MP 52二量体 (g/L)
0.8* アルギニン塩酸塩0.5M添加	0.37
1.6 "	0.62
2.4 "	0.98
3.2 "	0.95
2.4 アルギニン塩酸塩無添加	蛋白質の凝集が起こる

* 蛋白質濃度0.8 g/Lは従来のアルギニン塩酸塩無添加の蛋白質濃度上限値。

表1から、アルギニン塩酸塩を添加しないとリフォールディング溶液中で蛋白質が凝集し沈殿してしまうが、アルギニン塩酸塩の添加によりリフォールディング溶液あたりの蛋白質量を2.7倍に増やせる（すなわち0.37g/Lから0.98g/Lに増量）ことがわかる。緩衝液としては、リン酸、トリス塩酸を用いた緩衝液を使用することもできるが、pH8～10、特にpH8.9のアルギニン-水酸化ナトリウム緩衝液が好ましい。

リフォールディングした二量体を限外ろ過する工程は、リフォールディング終了後、リフォールディング溶液を分子分画量1万のフィルター、例えばPSU 10K（ザルトリウス社製）を用いて濃縮を行うとともに酸溶液例えば0.2%リン酸溶液で置換してCHAPS濃度を下げる。

溶媒置換された二量体を等電点沈殿処理する工程は、得られた二量体溶液にアルカリ例えば水酸化ナトリウムを添加し、pHを7.4に調節し、骨誘導因子を選択的に沈殿させることにより実施される。pH調節後溶液を1時間以上放置し、遠心分離またはろ過し、上清を除き、沈殿を酸溶液例えば50mMクエン酸、0.2%リン酸または0.05%トリフルオロ酢酸溶液に溶解する。

等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程は、上で得られた酸性溶液を高圧液体クロマトグラフィーにかけ、有機溶媒、例え

ばイソプロパノール、アセトニトリルまたはエタノール0～55%のグラジエントで溶出させ、骨誘導因子の二量体の分画を採取することにより実施される。高圧液体クロマトグラフィーの担体としては高分子系担体、例えばSOURCE 15 RPC (6 cm ϕ \times 20 cm、ファルマシアバイオテク社製) が用いられる。

本発明における骨誘導因子としては、MP 5 2、BMP-2、BMP-4、BMP-6、あるいはBMP-7からなる群から選ばれるいずれか一つの単一な分子量からなる骨誘導因子が好適に使用される。例えばヒトMP 5 2前駆体をコードするcDNAを導入した大腸菌株(具体的には成熟型MP 5 2のN末端のアラニンを削除した119残基よりなるMP 5 2配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドン相结合させたプラスミドを導入した大腸菌)を用い、それを培養し、成熟型MP 5 2単量体を封入体として多量に生産させ、その封入体より本発明の製法を用い高純度の成熟型MP 5 2を得ることができる。

実施例

次に、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。操作はタンパク質の安定性を考慮し(2)から(4)までは4℃の低温で行う。それぞれの工程の内容を以下に記す。

(1) ヒトMP 5 2の培養と封入体の粗精製

WO 96/33215の実施例2と同様にして得られたMP 5 2産生大腸菌を改変SOC培地で前培養した後、生産用培地100Lに前培養液を植菌する。対数増殖前期に1mMのイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し誘導をかけ、OD₅₅₀=1.50まで32℃で培養を行う。その後集菌を行い、菌体を25mMトリス塩酸(pH 7.3)、10mM EDTA・4Naを含む緩衝液に懸濁し菌体破碎装置(マントン・ゴーリン社製)で破碎し、遠心分離によって封入体を回収する。封入体を洗浄成分含有バッファ

ー 1 M 尿素で洗浄した後、遠心分離を行い粗精製された封入体を得る。

(2) 封入体の可溶化とリフォールディング

上記により得られた封入体の湿重量 100 g を、8 M 尿素および 5 mM エチレンジアミン四酢酸を含む 50 mM グリシン-水酸化ナトリウムバッファー (pH 8.9) 300 mL に加えて攪拌溶解する (蛋白質濃度は約 18 mg/mL)。この封入体溶解液をリフォールディング・バッファー [0.5 M アルギニン-水酸化ナトリウム (pH 8.9)、4.8 mM システイン塩酸塩一水和物、0.5 M 塩化ナトリウム、20 mM CHAPS] に 6.7 倍希釈 (蛋白質濃度 2.4 mg/mL になるように) してリフォールディングを行なう。このまま 4 °C で 20 時間程度放置する。

(3) リフォールディング後の MP 52 の精製 (限外ろ過)

リフォールディング反応が終了した MP 52 を分子分画量 1 万のフィルター (PSU 10K, ザルトリウス社製) を用いて 5 倍濃縮を行うとともに、0.2 % リン酸溶液で 5 倍希釈を行い溶媒置換する。この操作を 3 回繰り返すことにより理論的には CHAPS 濃度が 100 倍以上に希釈される。

(4) リフォールディング後の MP 52 の精製 (等電点沈殿)

溶媒置換されたリフォールディング溶液に水酸化ナトリウム溶液を添加することにより pH を 7.4 に調節し、等電点沈殿を行なう。溶液が白濁後 1 時間以上放置し、ついで遠心分離 (10,000 g × 15 分) を行い、沈殿を回収する。沈殿を 0.2 % リン酸溶液に溶解する。

(5) リフォールディング後の MP 52 の精製 (逆相クロマトグラフィー)

リン酸溶液に溶解した MP 52 を逆相クロマトグラフィーにて二量体以外の成分の分離をおこなう。担体として SOURCE 15 RPC (6 cm φ × 20 cm、ファルマシアバイオテック社製) を用い、高速液体クロマトグラフィー装置で運転し、エタノール 0 ~ 50 % のグラジェントで溶出させ、MP 52 の二量体の分画を回収する。

以上の精製法により、表 2 に示す高収率で活性型 MP 52 を回収するこ

とに成功した。精製の各工程のMP 5 2量は、電気泳動ゲルのC B B染色画像走査定量法により求めた。

表 2

工 程	MP 5 2 量 (g)	収率 (%)
溶 解	5.4	100
リフォールディング	2.2	41
限外ろ過	1.6	30
等電点沈殿	1.5	29
逆相クロマトグラフィー	1.1	21

本工程のメリットの一つとして、精製にかかるコストの削減効果があげられる。試算によると、WO 96/33215と比較して蛋白質当たりの製造単位が約半分になるため、工業化するにあたり、非常に有益な精製法である。

本発明の製造方法によれば、単一な分子量からなる骨誘導因子二量体が効率よく、大量に、しかも従来法と比較して安価に産生することができる。

請 求 の 範 囲

1. 遺伝子工学的的方法により産生された骨誘導因子の封入体を下記工程 a) ～ e) に順次付して骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする精製された骨誘導因子二量体の製造方法。
 - a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程、
 - b) 得られた可溶化単量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程、
 - c) リフォールディングした二量体を限外ろ過および溶媒置換処理する工程、
 - d) 上記処理により得られた二量体溶液を等電点沈殿処理する工程、
 - e) 等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。
2. 前記封入体が、遺伝子工学的的方法により大腸菌に発現させた骨誘導因子の封入体である請求項 1 に記載の製造方法。
3. 変性剤終濃度が 1 ～ 4 M である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。
4. リフォールディング溶液が、システインまたはその塩が蛋白質 1 mg あたり 0.1 ～ 1.0 mg/mL の濃度、塩化ナトリウムが 0.1 ～ 1.5 M の濃度、コール酸またはその誘導体が 5 ～ 100 mM の濃度からなる緩衝液であり、その pH が 8 ～ 10 の範囲である請求項 1 から請求項 3 のいずれかの項に記載の製造方法。
5. リフォールディング溶液が、さらにグアニジノ基を有する化合物またはその塩を含む緩衝液である請求項 4 に記載の製造方法。
6. 骨誘導因子が、MP52、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7 からなる群から選択されたいずれか 1 つの骨誘導因子である請求項 1 から請求項 5 のいずれかの項に記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12P21/02//C07K14/51, C12N15/09, (C12P21/02, C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12P21/02, C07K14/51, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEBS Letters Vol. 345 (1994) p.125-130, "Refolding proteins by gel filtration chromatography", Milton H. Werner et al.	1-6
A	Molecular Immunology Vol. 32, No. 12 (1995) p.873-881, "A GENETICALLY ENGINEERED SINGLE-CHAIN FV/TNF MOLECULE POSSESSES THE ANTI-TUMOR IMMUNOREACTIVITY OF FV AS WELL AS THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF TUMOR NECROSIS FACTOR", JUNGBAO YANG et al.	1-6
A	Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 204, No. 2 (1994) p.646-652, "CLONING AND EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 5", Gertrud Hotten et al.	1-6
A	WO, 96/33251, A1 (HOECHST JAPAN LTD.), October 24, 1996 (24. 10. 96) & AU, 9653470, A & JP, 8-531621, A	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search March 30, 1998 (30. 03. 98)		Date of mailing of the international search report April 7, 1998 (07. 04. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P 21/02//C07K 14/51, C12N 15/09,
(C12P 21/02, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P 21/02, C07K 14/51, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FEBS Letters Vol. 345(1994)p. 125-130, "Refolding proteins by gel filtration chromatography", Milton H. Werner et al.	1-6
A	Molecular Immunology Vol. 32, No. 12(1995)p. 873-881, "A GENETICALLY ENGINEERED SINGLE-CHAIN FV/TNF MOLECULE POSSESSES THE ANTI-TUMOR IMMUNOREACTIVITY OF FV AS WELL AS THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF TUMOR NECROSIS FACTOR", JUNGBAO YANG et al.	1-6
A	Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 204, No. 2(1994)p. 646-652, "CLONING AND EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 5", Gertrud Hotten et al.	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.03.98

国際調査報告の発送日

07.04.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

印

4 B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/33251, A1 (HOECHST JAPAN LTD) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) & AU, 9653470, A&JP, 8-531621, A	1 - 6

DERWENT-ACC-NO: 1998-427506**DERWENT-WEEK:** 200878*COPYRIGHT 2009 DERWENT INFORMATION LTD***TITLE:** Dimer of bone derived factor useful for
treating bone disorders**INVENTOR:** ANDOU H; BECHTOLD R ; HONDA J ; HOTTEN G ;
POHL J ; SUGIMOTO S**PATENT-ASSIGNEE:** HOECHST MARION ROUSSEL KK[HMRI] ,
HOECHST MARION ROUSSEL LTD[HMRI] ,
NIPPON HOECHST MARION ROUSSEL LTD
[HMRI] , ANDOU H[ANDOI] , BECHTOLD R
[BECHI] , BIOPHARM GES
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKL[BIOPN] ,
HONDA J[HONDI] , HOTTEN G[HOTTI] ,
POHL J[POHLI]**PRIORITY-DATA:** 1996JP-355812 (December 25, 1996) ,
1997WO-JP04784 (December 24, 1997) ,
1999EP-115613 (August 6, 1999) , 2000WO-
EP07600 (August 4, 2000)**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
WO 9829559 A1	July 9, 1998	JA
AU 9853395 A	July 31, 1998	EN
NO 9903151 A	June 24, 1999	NO
EP 949335 A1	October 13, 1999	EN
ZA 9711580 A	November 24, 1999	EN
CN 1242052 A	January 19, 2000	ZH
BR 9714183 A	February 29, 2000	PT
JP 10529827 X	May 16, 2000	JA
HU 200002573 A2	December 28, 2000	HU
MX 9905882 A1	January 1, 2000	ES

KR 2000062328 A	October 25, 2000	KO
US 6551801 B1	April 22, 2003	EN
US 20040019185 A1	January 29, 2004	EN
EP 949335 B1	May 6, 2004	EN
DE 69728997 E	June 9, 2004	DE
ES 2216181 T3	October 16, 2004	ES
EP 949335 B2	November 19, 2008	EN

DESIGNATED-STATES: AL AU BA BB BG BR CA CN CU CZ EE GE
 HU ID IL IS JP KR LC LK LR LT LV MG
 MK MN MX NO NZ PL RO SG SI SK SL TR
 TT UA US UZ VN YU AT BE CH DE DK EA
 ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU
 MC MW NL OA PT SD SE SZ UG ZW A L AT
 BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI
 LT LU LV MK NL PT RO SE SI AL AT BE
 CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT
 LU LV MK NL PT RO SE SI AL AT BE CH
 DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU
 LV MK NL PT RO SE SI

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
WO1998029559A1	N/A	1997WO- JP04784	December 24, 1997
ZA 9711580A	N/A	1997ZA- 011580	December 23, 1997
BR 9714183A	N/A	1997BR- 014183	December 24, 1997
CN 1242052A	N/A	1997CN- 181005	December 24, 1997
DE 69728997E	N/A	1997DE- 628997	December 24, 1997
EP 949335A1	N/A	1997EP- 950371	December 24, 1997

EP 949335B1	N/A	1997EP- 950371	December 24, 1997
EP 949335B2	N/A	1997EP- 950371	December 24, 1997
NO 9903151A	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
EP 949335A1	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
BR 9714183A	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
JP 10529827X	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
HU 200002573A2	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
KR2000062328A	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
US 6551801B1	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
EP 949335B1	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
DE 69728997E	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
EP 949335B2	PCT Application	1997WO- JP04784	December 24, 1997
AU 9853395A	N/A	1998AU- 053395	December 24, 1997
JP 10529827X	N/A	1998JP- 529827	December 24, 1997
MX 9905882A1	N/A	1999MX- 005882	June 22, 1999
KR2000062328A	N/A	1999KR- 705776	June 24, 1999
NO 9903151A	N/A	1999NO- 003151	June 24, 1999
US 6551801B1	N/A	1999US- 331948	July 7, 1999

HU 200002573A2	N/A	2000HU-002573	December 24, 1997
US20040019185A1	Based on	2003US-414954	April 16, 2003

INT-CL-CURRENT:

TYPE	IPC DATE
CIPP	C12N15/12 20060101
CIPS	C07K14/51 20060101
CIPS	C07K14/51 20060101
CIPS	C12N15/09 20060101
CIPS	C12P21/02 20060101

RELATED-ACC-NO: 2000-097122**ABSTRACTED-PUB-NO:** WO 9829559 A1**BASIC-ABSTRACT:**

Dimer of bone derived factor is produced in a process which comprises forming a dimer from a genetically engineered bone derived factor inclusion body in a process which comprises:

- (a) treating the inclusion body with a denaturing agent and forming a soluble monomer;
- (b) treating the monomer with a refolding agent and forming a dimer;
- (c) ultrafiltration of the dimer and carrying out a solvent replacement treatment;
- (d) carrying out an isoelectric precipitation on the

dimer solution, and

(e) purifying the precipitated dimer by reverse phase chromatography.

USE - The dimer is of use in the treatment of bone disorders.

ADVANTAGE - The process is more economical than conventional methods and gives higher yields.

TITLE-TERMS: DIMER BONE DERIVATIVE FACTOR USEFUL TREAT
DISORDER

DERWENT-CLASS: B04 D16 D21

CPI-CODES: B04-H0100E; B14-N01; D05-H13; D05-
H17B2;

CHEMICAL-CODES: Chemical Indexing M1 *01* Fragmentation
Code M423 M781 P714 Q233 V600 V642

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: 1998-128828